

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift
①1 DE 3433076 A1

⑤1 Int. Cl. 4:
C07 K 15/22
A 61 K 37/14

②1 Aktenzeichen: P 34 33 076.3
②2 Anmeldetag: 8. 9. 84
④3 Offenlegungstag: 20. 3. 86

DE 3433076 A1

⑦1 Anmelder:
Weser, Ulrich, Prof. Dr.; Hartmann, Hans-Jürgen,
Dr.; Gärtner, Alfred, Dipl.-Biochem., 7400 Tübingen,
DE

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤4 Verfahren zur Isolierung und Anwendung von Kupfer-Metallothioneinen zur antirheumatischen Therapie

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Gewinnung von Kupfer-Metallothioneinen aus Wirbeltieren, Mikroorganismen oder Pflanzen, wobei das entsprechende Homogenat einer Hitzebehandlung unterworfen wird, um nutzlose Proteine auszufällen und das gewünschte Kupfer-Metallothionein aus dem Überstand durch chromatographische Verfahren gereinigt wird. Des weiteren betrifft die Erfindung die Anwendung von Kupfer-Metallothioneinen als pharmazeutische Präparate zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Kupfer-Metallothioneine direkt in das entzündete Gewebe, vorzugsweise die entzündete Gelenkkapsel injiziert werden.

DE 3433076 A1

PROF. DR. ULRICH WESER
ANORGANISCHE BIOCHEMIE
PHYSIOL.-CHEM. INSTITUT
DER UNIVERSITÄT TüBINGEN

D-7400 TüBINGEN 1.5. September 1984
HOPPE-SEYLER-STR. 1
TEL. 0 70 71 / 29 63 91 + 29 33 44

3433076

Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Isolierung von Kupfer-Metallothionein aus Wirbeltieren, Mikroorganismen, insbesondere Hefen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man das entsprechende Homogenat einer Hitzebehandlung unterwirft, um nutzlose Proteine auszufällen und aus der erhaltenen Lösung durch chromatographische Verfahren das gewünschte Kupfer-Metallothionein isoliert.

- 2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass bei Verwendung von Mikroorganismen und Pflanzen eine vorherige Kultivierung mit kupferhaltigen Lösungen vorgenommen wird.

Isolierung und Anwendung von Kupfer-Metallothioneinen zur anti-
rheumatischen Therapie

ABSTRACT

Die Erfindung betrifft ein Verfahren der im Oberbegriff des Anspruchs 1) angegebenen Art.

Die Erfindung besteht darin, dass man das entsprechende Homogenat einer Hitzebehandlung unterwirft, um nutzlose Proteine auszufällen und aus der erhaltenen Lösung durch chromatographische Verfahren das gewünschte Kupfer-Metallothionein isoliert.

Metallothioneine sind relativ einfache Proteine, die in der gesamten belebten Natur vorkommen. Über die biologische Rolle dieser niedermolekularen Metall-Schwefelproteine ist sehr wenig bekannt. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist ungewöhnlich. Sie enthalten keinen oder höchstens einen aromatischen Aminosäure-Rest und bis zu 33% Cystein, eine schwefelhaltige Aminosäure. Die Bildung von Metallothioneinen kann in den Organismen durch Anbieten von Zink, Cadmium, Kupfer, Quecksilber und Silber induziert werden. Im allgemeinen enthalten Metallothioneine aus Wirbeltieren die biochemisch wichtigen Metalle Kupfer und Zink.

Metallothioneine aus Wirbeltieren haben ein Molekulargewicht von ca. 7000, die Metallothioneine aus Hefen und Pflanzen sind etwas kleiner (Molekulargewicht von 5000-6000). Die strukturellen Eigenschaften der letztgenannten ähneln denen der Wirbeltierthioneine so stark, daß von einer einheitlichen Klasse der Metallothioneine gesprochen wird. In Wirbeltieren kommen Metallothioneine in der Leber, in der Niere und in der Darmmucosa vor. Pflanzen bilden Metallothioneine in den Wurzeln.

Die Metalle werden in diesen niedermolekularen Proteinen von vier Schwefelatomen gebunden, wobei das Kupfer in der stabilen Kupfer-(I)-Form gehalten wird. Daher zählen die Kupfer-Metallothioneine zu den Kupferproteinen mit der höchsten Kupferbindungskonstanten. Einem Angriff durch Oxidationsmittel halten diese Kupferbindungszentren jedoch nicht stand.

Über die biologische Rolle der Metallothioneine wird weitgehend spekuliert. Ein direkter Übergang von Kupfer-(I) in andere Kupferproteine, die vom Metall befreit waren, wurde gemessen. Desweiteren ist ein Mechanismus bekannt, in dem über enzymatischen oxidativen Abbau Kupfer-(II) entsteht (Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Band 2, 1985, im Druck), und so essentielles Kupfer-(II) im Organismus bereitgestellt werden kann. Dies könnte auf eine Metallspeicherfunktion bei Thioneinen hindeuten.

Besonders deutlich wird dies bei prä- bzw. post-natalen Veränderungen des Leberkupferspiegels bei Säugetieren. Die Leber des Fötus enthält bis zur zwanzigfachen Menge an Kupferthionein gegenüber der Leber des erwachsenen Organismus. Dies wird damit erklärt, daß bei der Geburt eine Umstellung des Stoffwechsels auf die Sauerstoffatmosphäre erfolgt. Gerade in der Biochemie des Sauerstoffs spielen viele Kupferproteine eine entscheidende Rolle (z.B.: Cytochromoxidase, Superoxiddismutase). Zur Bildung dieser Kupferproteine in der Entwicklungsphase wird das Kupfer aus dem in der fötalen Leber gespeicherten Kupfer-Metallothionein herangezogen.

Eine andere physiologische Rolle könnten die Metallothioneine bei der Entgiftung toxischer Schwermetalle spielen. Giftige Metalle wie Cadmium und Quecksilber werden ebenfalls in Metallothioneinen gebunden, immobilisiert und damit dem Stoffwechsel entzogen.

Kupfer und Kupferproteine sind nicht nur in der Biochemie des Sauerstoffs von Bedeutung, sondern auch im Entzündungsgeschehen sind sie von großer Wichtigkeit. Bei entzündlichen Erkrankungen steigt der

Kupferspiegel im Serum von Wirbeltieren bis auf das Vierfache des Normalwertes. Das zusätzlich benötigte Kupfer stammt möglicherweise ebenfalls aus den in der Leber lokalisierten Kupfer-Metallothioneinen.

Am Entzündungsherd selbst erzielt Kupfer einen heilsamen Effekt, indem es die Gefäßneubildung (Angiogenese) begünstigt. Desgleichen fördert es generell die Rückbildung entzündlicher Herde. Nicht umsonst wurde Kupfer schon im Altertum, Ägypten, Rom und im Mittelalter bei allen Arten entzündlicher Erkrankungen verabreicht.

Bei degenerativen Gelenkserkrankungen, die unter den Oberbegriff Rheuma fallen (z.B. Arthritis, Arthrose, Gicht), wandern Phagozyten (Makrophagen, polymorphonukleare Leukozyten) in den Gelenkspalt ein. Diese Vertreter der zellulären Abwehr produzieren Superoxid, H_2O_2 und ClO^- , um vermeintliche Fremdkörper abzutöten. Die Superoxid-Radikale können durch Folgereaktionen in noch gefährlichere Sauerstoff-Radikale umgewandelt werden, die ihrerseits die in der Gelenkflüssigkeit vorhandenen Makromoleküle (z.B. Hyaluronsäure, Kollagen) zerstören. Damit verliert die Gelenkflüssigkeit analog verbrauchten Motoröls ihre "Schmierfähigkeit", so, daß die rheumatischen Beschwerden der Patienten verstärkt werden.

Bisher wurde eine Reihe von Kupferverbindungen in vielen verschiedenen Applikationsformen gegen rheumatische Beschwerden eingesetzt. Die Palette reicht vom einfachen Kupferarmband bis zum komplizierten Superoxiddismutase-Molekül. In der Veterinärmedizin wird zum Beispiel der superoxiddismutase-aktive Kupferkomplex des Salicylats unter dem Handelsnamen Dermcusal[®] verwendet. Desweiteren wird in der Tiermedizin das Kupferprotein Superoxiddismutase mit dem Namen Orgotein[®] in rheumatische Tiergelenke injiziert. Humanmedizinisch findet zum Abbau von Superoxid-Radikalen in menschlicher Gelenkflüssigkeit das pharmazeutische Präparat Peroxinorm[®] Verwendung. Auch dieses Präparat enthält das Kupferprotein Superoxiddismutase als Wirkstoff. Es wird in die Gelenkkapsel injiziert und setzt Superoxid-Radikale nach folgender Gleichung zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um:



Unglücklicherweise führt das Folgeprodukt dieser Reaktion, das Wasserstoffperoxid, ebenfalls zur Zerstörung der Gelenksflüssigkeit bzw. deren Hauptbestandteil, der Hyaluronsäure. Desweiteren erfolgt der oxidative Angriff polymorphonuklearer Leukozyten nicht allein über reaktive Sauerstoffspezies, sondern auch über Hypochlorid (ClO^-). Sinnvollerweise sollten diese hochreaktiven Komponenten nicht nur abgebaut, sondern auch deren Bildung gehemmt werden. Die Produktion der toxischen Moleküle erfolgt teils über Flavoenzyme (O_2^- , H_2O_2) und teils über Hämproteine (ClO^-). Über die molekulare Struktur der sauerstoffaktivierenden Enzyme (NADPH-Oxidasen) und des hypochloridbildenden Systems ist wenig bekannt. Viele Flavoenzyme werden durch Schwermetalle und insbesondere Kupfer gehemmt.

Wird Kupfer in niedermolekularer Form ins Gelenk gebracht, so wird es durch körpereigene Komplexbildner (Chelatoren) gebunden und relativ rasch vom Ort des Geschehens abtransportiert. Diese kurzzeitige "Überladung" des Gelenkes mit Kupfer resultiert in einem ebenfalls kurzzeitigem Heileffekt. Wird proteingebundenes Kupfer angeboten, so wird dies im Gelenk gelagert, weil es nicht durch die Synovialmembran diffundieren kann und zeigt so Depotwirkung. Kupfer in Kupferproteinen oder Bruchstücken davon und insbesondere in Kupfer-Metallothioneinen wird durch reaktive Sauerstoffspezies langsam freigesetzt. Dieses "freie" Kupfer wird in der Gelenksflüssigkeit durch körpereigene Komplexbildner gebunden. Die gebildeten Komplexe haben eine ähnlich hohe Superoxiddismutaseaktivität wie die Superoxiddismutase selbst (Journal of Molecular Catalysis, Band 13, Seite 249, 1981). Nach dem Transport des chelierten Kupfers durch die Synovialflüssigkeit wird das Kupfer von Proteinen, hauptsächlich Flavoenzymen abgefangen, die dadurch gehemmt werden. Durch den Mechanismus der langsamen Freisetzung wird über eine längere Zeit ein gleichmäßiger Kupferspiegel im Gelenk aufrechterhalten. Die ebenfalls freigesetzten Schwefelgruppen des Metallothioneins, an denen das Kupfer gebunden war, wirken als Radikalfänger und damit ebenfalls als Antioxidationsmittel.

In eigenen Versuchen konnten wir zum erstenmal nachweisen, daß das Kupfer aus Kupfer-Metallothionen durch Flavoenzyme mittels Wasserstoffperoxid freigesetzt wird (Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Band 2 1985, im Druck). Diese Ergebnisse ermutigten detailliertere Nachforschungen in dieser Richtung. Im Einzelnen wurde untersucht:

1. Der Einfluß des Kupfers auf die Reaktivität von Flavoproteinen.
2. Der Einfluß des Kupfers sowie der Kupfer-Metallothioneine auf die Zerstörung von Gelenksflüssigkeit durch Flavoenzyme.
3. Der Einfluß des Kupfers sowie der Kupfer-Metallothioneine auf die Zerstörung biologischer Makromoleküle durch isolierte Makrophagen und polymorphonukleare Leukozyten.

Zu 1:

Werden Flavoenzyme (Xanthinoxidase, D- oder L-Aminosäureoxidase u. a.) mit Kupfer versetzt, so wird ihre Enzymaktivität fast vollständig gehemmt. Diese Hemmung verläuft reversibel. Bei Entfernung des Kupfers erhält man wieder fast vollständige Aktivität. Werden für diese Versuche Kupfer-Metallothioneine eingesetzt, so verläuft die Hemmung langsamer, da das Kupfer erst aus den Thioneinen freigesetzt werden muß. Durch Elektronenspinresonanz-Spektrometrie konnte gezeigt werden, daß das freigesetzte Kupfer nicht am Metallothionein verbleibt, sondern von den Flavoproteinen gebunden wird.

Zu 2:

Werden Flavoenzyme zu Gelenkflüssigkeit zugegeben, so tritt eine Zerstörung der Makromoleküle in dieser Flüssigkeit ein. Damit verbunden ist eine Verkleinerung der Viskosität, die mit geeigneten Viskosimetern gemessen werden kann. Derselbe Effekt läßt sich beobachten, wenn man statt Synovialflüssigkeit nur ihren Hauptbestandteil, die Hyaluronsäure verwendet. Die Zerstörung beruht hauptsächlich auf oxidativem Abbau durch Wasserstoffperoxid. Wird Kupfer oder Kupfer-Metallothionein als Schutzmechanismus verwendet, so wird der Abbau der Gelenkflüssigkeit gehemmt. Ein ähnlicher Effekt läßt sich auch erzielen, wenn Katalase zugegeben wird, da diese Wasserstoffperoxid abbaut. Der Vorteil des Kupfers liegt darin, daß es schon einen Schritt früher angreift, nämlich die Bildung des Wasserstoffperoxids hemmt.

Zu 3:

Makrophagen und polymorphonukleare Leukozyten sind die Hauptvertreter des zellulären Abwehrsystems. Bei der Zerstörung körperfremder Stoffe bilden

sie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hypochlorid. Durch diese reaktiven Stoffe wird nicht nur körperfremdes, sondern auch körpereigenes Material angegriffen. Bei rheumatischen Gelenkserkrankungen führt dies zu einer weiteren Schädigung der ohnehin schon angegriffenen Gelenkkapsel und damit zu einer Verstärkung der Beschwerden. Der Angriff polymorphonuklearer Leukozyten läßt sich mit zwei Methoden verfolgen. Zum Einen kann die Superoxidproduktion mit dem Cytochrom c Reduktase Test oder dem Formazan Test verfolgt werden und zum Anderen kann die Hypochloridproduktion anhand der Bleichung geeigneter Substrate (Cytochrom c, β -Karotin) gemessen werden. Unsere Versuche ergaben, daß die Reaktivität von polymorphonuklearen Leukozyten und Makrophagen bei Zugabe von Kupfer vollständig gehemmt wird. Keines der angebotenen Substrate wurde geschädigt, wenn Kupfer vorhanden war, wohl aber wenn auf die Zugabe von Kupfer verzichtet wurde. Dieses Ergebnis wurde sowohl mit Kupfersalzen als auch mit Kupfer-Metallothionein erzielt. Der Wirkungsmechanismus dürfte derselbe sein wie in den vorhergegangenen Versuchen. Nach oxidativer Freisetzung des Kupfers wird es an Flavoenzyme gebunden und hemmt deren Aktivität.

Als besonders effektiv erwiesen sich in allen Versuchen die Kupfer-Metallothioneine aus Hefe, da sie im Gegensatz zu Wirbeltier-Thioneinen ausschließlich Kupfer und kein anderes Metall enthalten. Desweiteren sind sie stabiler als Wirbeltier-Thioneine und setzen so langsamer Kupfer frei. Dadurch wird über einen längeren Zeitraum ein konstanter Kupferspiegel im Gelenk aufrechterhalten.

Immunologisch sind Kupfer-Metallothioneine äußerst schwach aktiv, da sie kleine und relativ einfache Proteine sind. Ihre Anwendung im Gelenk wird daher keine immunologischen Probleme aufwerfen, zumal sie in der Gelenkkapsel dem humoralen Immunsystem entzogen sind.

Ein anderer Aspekt in Bezug auf Kupfer im Entzündungsgeschehen ist das Caeruloplasmin. Caeruloplasmin ist das Kupfer-Transportprotein im Serum von Wirbeltieren. Daneben hat es Ferroxidase- und Ascorbatoxidase-Aktivität. Bei entzündlichen Prozessen ist Caeruloplasmin im Serum der Wirbeltiere bis auf das Vierfache gegenüber dem Normalwert erhöht. In kleinen Konzentrationen kommt Caeruloplasmin auch in der Gelenksflüssigkeit vor. Bei arthritischen Erkrankungen sinkt sowohl die Ferroxidase- als auch die Ascorbat-

oxidase-Aktivität im Gelenk stark ab. Der Abbau der aktiven Kupferzentren könnte im Gelenk eine Kupfer-Mangelsituation entstehen lassen. Es wäre deshalb logisch, bei Gelenkserkrankungen Caeruloplasmin ins Gelenk zu injizieren, zumal Caeruloplasmin viel Kupfer enthält (sechs Grammatom Kupfer pro Molekül. Dieses Verfahren hat drei entscheidende Nachteile:

1. Caeruloplasmin ist ein relativ großes Protein, das schwer in großen Mengen beschaffbar ist.
2. Caeruloplasmin ist äußerst instabil und schwer zu handhaben.
3. Caeruloplasmin ist immunologisch stark aktiv. Es können schwere immunologische Schocks auftreten.

Die Erfindung betrifft ein einfaches und schnelles Verfahren zur Isolierung von Metallothioneinen, insbesondere Kupfer-Metallothioneinen. Das Verfahren der Erfindung ermöglicht die Isolierung von Thioneinen aus der Leber von Wirbeltieren, aus Hefen und aus Mikroorganismen.

Dazu wird durch geeignete Aufschlußverfahren ein Homogenat des betreffenden Organs bzw. Organismus hergestellt. Bei Leber und Pflanzen ist ein mechanischer Aufschluß in Mixgeräten vorteilhaft, bei Hefen empfiehlt sich ein Aufschluß durch Hochdruckhomogenisation oder andere bekannte Zellaufschlußverfahren.

Nach einer Zentrifugation wird eine Hitzebehandlung des Überstandes durchgeführt, wobei unerwünschte Proteine ausgefällt werden. Alternativ kann die Hitzebehandlung des Homogenats ohne vorherige Zentrifugation erfolgen. Die Hitzebehandlung wird bei 40-80 °C, insbesondere 50-70 °C, vorzugsweise 60 °C für 1 Minute bis 1 Stunde, insbesondere 2-10 Minuten, vorzugsweise 3 Minuten durchgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand durch chromatographische Methoden gereinigt.

Die folgenden Beispiele sollen exemplarisch das Verfahren zur Isolierung von Metallothioneinen erläutern.

Beispiel 1:

Isolierung von Kupfer-Metallothionein aus Bäckerhefe

1 kg Bäckerhefe wurde 24 Stunden mit 1 millimolar Kupfersalz kultiviert. Die Zellen wurden 2 mal mit Leitungswasser gewaschen, in 1 Liter Wasser suspendiert und in einem Hochdruckhomogenisator bei 700 bar homogenisiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Homogenat zentrifugiert. Der Überstand wurde 3 Minuten lang auf 60 °C erhitzt, abgekühlt, zentrifugiert, und bei pH 8,0 molekularsiebfiltriert (Epichlorhydrin-quervernetztes Dextran, Ausschlußvolumen 5 000). Die Kupfer-Metallothionein-haltige Fraktion wurde einer Ionenaustauschchromatographie unterworfen (quervernetztes quartäres Aminoäthyl-Dextran für Moleküle unter einem Molekulargewicht von 30 000). Es wurde mit einem linearen Gradient von 0-200 millimolar NaCl, pH 8,0 eluiert. Die gefriergetrocknete Kupfer-Metallothioneinfraktion wurde über Molekularsiebfiltration (Epichlorhydrin-quervernetztes Dextran, Ausschlußvolumen 30 000) entsalzt und erneut gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 110 mg Kupfer-Metallothionein mit einem Kupfergehalt von 5,1% (w/w).

Beispiel 2:

Isolierung von Kupfer,Zink-Metallothionein aus fötaler Rinderleber

200 g Leber (160 µg Kupfer/Gramm Naßgewicht) wurden grob zerkleinert und in einem Mixgerät mit 150 Milliliter Wasser in Gegenwart von 1 millimolar 2-Mercaptoäthanol homogenisiert. Der zentrifugierte Überstand wurde einer Hitzebehandlung unterzogen (2 Minuten, 60 °C). Der abgekühlte, zentrifugierte Überstand wurde bei pH 8,6 molekularsiebfiltriert (Epichlorhydrin-quervernetztes Dextran, Ausschlußvolumen 5 000) und die Kupfer/Zink-Thionein-haltige Fraktion über Ionenaustauscher-Chromatographie weiter gereinigt (quervernetztes Diäthylaminoäthyl-Dextran für Moleküle unter einem Molekulargewicht von 30 000). Es wurde ein linearer Gradient von 0-200 millimolar NaCl, pH 8,6 angewandt. Nach Gefriertrocknung und Entsalzung über Molekularsiebfiltration in destilliertem Wasser (Epichlorhydrin-quervernetztes Dextran, Ausschlußvolumen 30 000) wurde das gereinigte Protein erneut gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 95 Milligramm an Kupfer/Zink-Thionein mit einem Kupfer-Gehalt von 5,3% und einem Zink-Gehalt von 1,5 Prozent.

Desweiteren betrifft die Erfindung die Anwendung von Kupferproteinen oder Untereinheiten oder Bruchstücken davon, insbesondere Metallothioneinen, vorzugsweise Kupfer-Metallothioneinen zur antirheumatischen Therapie, indem die Metallothioneine direkt in die Gelenkkapsel injiziert werden. Durch reaktive Verbindungen, die bei rheumatischen Erkrankungen entstehen, wird aus den Metallothioneinen Kupfer freigesetzt, das wiederum die Bildung dieser reaktiven Verbindungen hemmt und deren Abbau beschleunigt.

Im Einzelnen ist der heilsame Effekt von Metallothioneinen auf folgende Tatsachen gestützt:

1. Die aus den Metallothioneinen freigesetzten Schwefelgruppen können stöchiometrisch mit Radikalen aller Art reagieren. Sie haben die Wirkung eines Antioxidationsmittels.
2. Das aus Metallothioneinen freigesetzte Kupfer hemmt nicht nur die Bildung von Superoxidradikalen durch die Xanthinoxidase, sondern auch die Harnsäureproduktion. Die Ablagerung von Harnsäurekristallen bei gichtbedingter Arthritis wird daher durch die Hemmung der Xanthinoxidase eingeschränkt.
3. Das aus Metallothioneinen freigesetzte Kupfer wird von körpereigenen Komplexbildnern (freie Aminosäuren, Fettsäuren u. a.) im Gelenk gebunden und diffundiert durch die Synovialflüssigkeit, bevor es von Proteinen (z. B. Flavoenzyme) eingefangen wird. Diese niedermolekularen Kupferkomplexe haben teilweise eine höhere Superoxiddismutase-Aktivität als die Superoxiddismutase selbst (Biochimica et Biophysica Acta, Band 631, Seite 232, 1980). Sie können sehr effektiv Superoxidradikale abbauen.
4. Das aus Metallothioneinen freigesetzte Kupfer wird, nachdem es durch die Synovialflüssigkeit diffundiert ist, an Flavoenzyme gebunden und hemmt sie dadurch. In eigenen Versuchen haben wir nachgewiesen, daß bei einer ganzen Reihe von Flavoenzymen sowohl die Superoxid- als auch die Wasserstoffperoxid- und die Harnsäureproduktion durch Kupfer gehemmt wird. Die Zerstörung der Synovialflüssigkeit durch reaktive Sauerstoffspezies wird eingedämmt. Abbildung 1 zeigt den Viskositätsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit bei Synovialflüssigkeit die mit Flavoenzymen inkubiert wurde in

Anwesenheit und in Abwesenheit von Kupfer-Metallothionein.

Abbildung 1: Zerstörung von Synovialflüssigkeit und deren Schutz durch Kupfer bzw. Kupfer-Metallothionein.

Abbildung 2 zeigt die Bindung des aus Kupfer-Metallothionein freigesetzten Kupfers anhand von Elektronenspinresonanz-Spektrometrie. Das Kupfer in Metallothioneinen liegt als Kupfer (I) vor und ergibt kein Signal. Wird das Kupfer künstlich aus Metallothionein freigesetzt (z.B. mit Wasserstoffperoxid), so erhält man ein Signal für unspezifisch gebundenes Kupfer, sogenanntes Biuret-Kupfer. Wird das Kupfer aus Metallothioneinen mit Flavoenzymen freigesetzt, so erhält man ein Signal, das auf eine spezifische Kupferbindung an den Flavoenzymen hindeutet, sogenanntes Typ-2-Cu (II).

Abbildung 2: Nachweis der Bindung des aus Kupfer-Metallothioneinen freigesetzten Kupfers durch Flavoenzyme mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometrie.

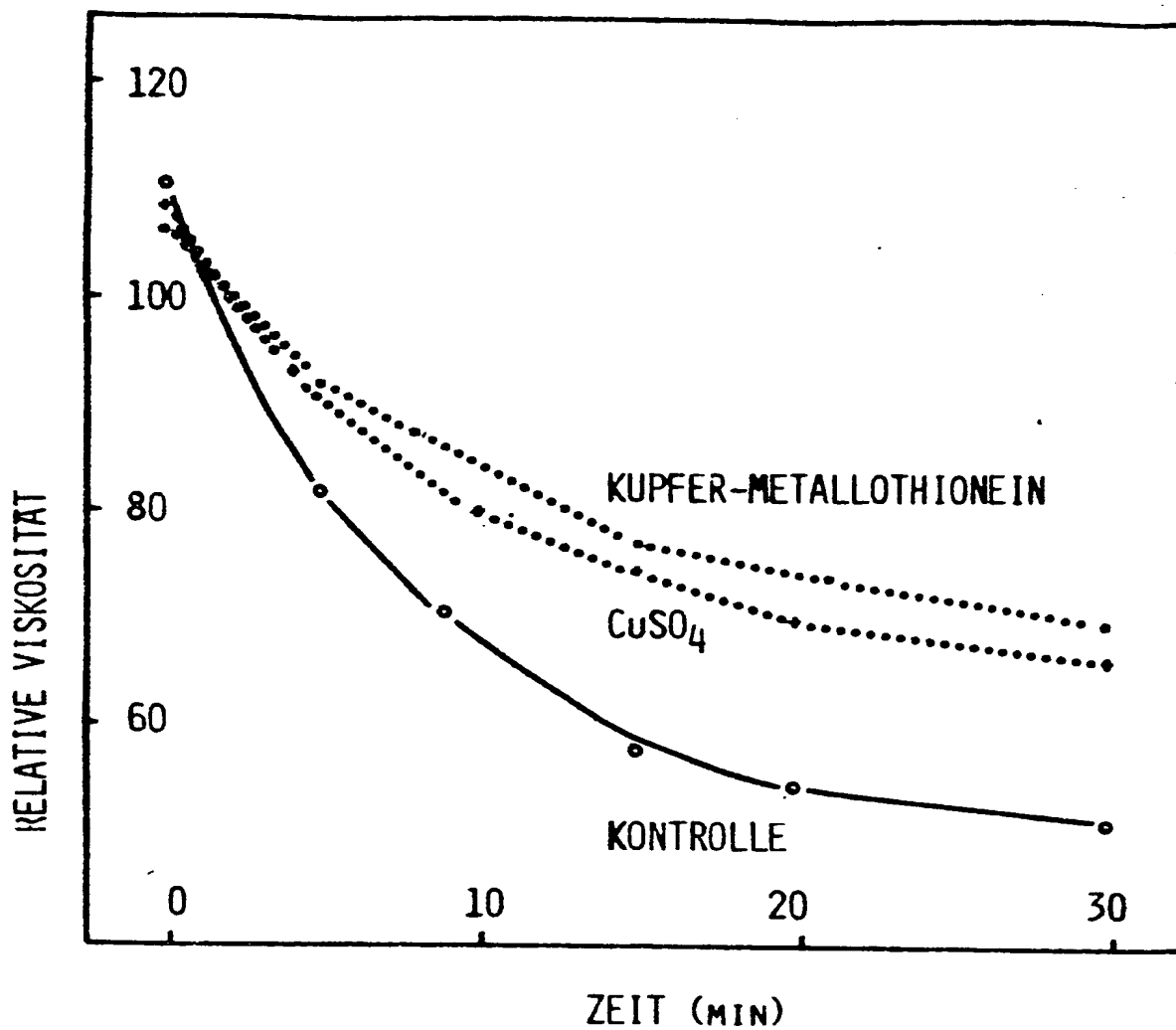
5. Das aus Metallothioneinen freigesetzte Kupfer begünstigt die Gefäßneubildung (Angiogenese)(Journal of the National Cancer Institute, Band 69, Seite 475, 1982). Durch Bildung neuer Gefäße (vor allem Kapillaren) wird die Versorgung der geschädigten Region und deren Reparatur positiv beeinflusst.
6. Das aus Metallothioneinen freigesetzte Kupfer wirkt sich allgemein günstig auf die Heilung entzündlicher Erkrankungen aus (Inflammatory Diseases and Copper, J.R.J. Sorenson (Hrsg), Humana Press, Clifton NJ, 1982)

7. Daneben wird ein Mechanismus diskutiert, in dem Kupfer in die Arachidonsäurekaskade eingreift. Es soll die Cyclooxygenase-Reaktion beeinflussen und dadurch die Bildung von Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) vermindern (Prostaglandins, Band 4, Seite 837, 1973).
8. Immunologisch treten mit den relativ einfachen Kupfer-Metallothioneinen kaum Probleme auf, da sie nur sehr schwach immunologisch aktiv sind und außerdem im Gelenk dem humoralen Immunsystem weitgehend entzogen sind.
9. Im Gegensatz zu synthetischen Antirheumatika sind keine Nebenwirkungen zu erwarten, da weder die Abbauprodukte des Thioneins, noch das Kupfer in den eingesetzten Konzentrationen toxisch sind.

Nummer:
Int. Cl. 4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

34 33 076
C 07 K 15/22
8. September 1984
20. März 1986

Abb. 1



KUPFER-METALLOTHIONEIN

KONSTLICH OXIDIERTES
KUPFER-METALLOTHIONEIN

MIT FLAVOENZYMEN OXIDIERTES KUPFER-
METALLOTHIONEIN, DAS KUPFER WIRD VON
DEN FLAVOENZYMEN SPEZIFISCH GEBUNDEN.

2.5

2.2

2.0

g-WERT